

Ингибирование репликации вируса клещевого энцефалита препаратами эпросартан и рибавирин *in vitro* и *in vivo*

*Г. Н. ЛЕОНОВА, О. С. МАЙСТРОВСКАЯ, В. А. ЛУБОВА

ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова», Владивосток

Inhibition of Tick-Borne Encephalitis Virus Replication with Eprosartan and Ribavirin *In Vitro* and *In Vivo*

*G. N. LEONOVA, O. S. MAISTROVSKAYA, V. A. LUBOVA

Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok

В настоящее время ведется активный поиск новых противовирусных веществ. Цель работы — выявление ингибирующей активности препарата эпросартан в сравнении с рибавирином *in vitro* и *in vivo* по отношению к вирусу клещевого энцефалита. Установлено значение половинной максимальной цитотоксической концентрации (CC_{50}) для эпросартана ($8,8 \pm 1,2$ мг/мл) и рибавирина ($1,074 \pm 0,16$ мг/мл). Для получения среднеэффективной вирусингибирующей концентрации (IC_{50}) препаратов использовали данные ИФА. С помощью нелинейного регрессионного анализа показателей процента антиген положительных проб получены значения IC_{50} изучаемых веществ, которое для эпросартана при лечебной схеме составило $0,64 \pm 0,23$ мг/мл. Селективный индекс (SI) или химиотерапевтический индекс (ХТИ) составил 13,7. IC_{50} рибавирина составила $0,0067 \pm 0,0015$ мг/мл, SI или ХТИ равен 160. На культуре клеток СПЭВ подавление репродукции вируса $\geq 2,0$ log TCID₅₀ происходило под действием эпросартана при концентрациях 1,2–3,0 мг/мл (лечебная схема), рибавирина — 0,2 мг/мл (профилактическая схема) и 0,2–0,0125 мг/мл (лечебная схема). На модели *in vivo* пробы с эпросартаном (1,5 и 0,6 мг/мл) по сравнению с контролем вируса показали увеличение выживаемости мышей до 50 и 20% и, соответственно, увеличение СПЖ на 5,2 и 2,1 дней. Пробы с рибавирином (0,05 и 0,025 мг/мл) увеличивали выживаемость мышей на 60 и 40% и, соответственно, увеличивали СПЖ на 7,3 и 4,8 дней. Полученные данные позволяют наряду с рибавирином рекомендовать препарат эпросартан в качестве активного средства против вируса КЭ.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, эпросартан, рибавирин, противовирусная активность.

Active search for new antiviral substances is currently underway. The purpose of this work is to identify the inhibitory activity of eprosartan medication in comparison with ribavirin *in vitro* and *in vivo* in relation to tick-borne encephalitis virus. The value of the half the maximum cytotoxic concentration (CC_{50}) for eprosartan (8.8 ± 1.2 mg/ml) and ribavirin (1.074 ± 0.16 mg/ml) was established. To obtain a medium effective virus-inhibiting concentration (IC_{50}) of the medications, EIA data were used. Using nonlinear regression analysis of the percentage of antigen positive samples, IC_{50} values of the studied substances were obtained, which for eprosartan was 0.64 ± 0.23 mg/ml in the treatment regimen. The selective index (SI) or chemotherapeutic index (CTI) was 13.7. The IC_{50} of ribavirin was 0.0067 ± 0.0015 mg/ml, SI or CTI was 160. The suppression of viral reproduction ≥ 2.0 log TCID₅₀ occurred in PEK cell culture under the influence of eprosartan at concentrations of 1.2–3.0 mg/ml (treatment regimen), under the influence of ribavirin — 0.2 mg/ml (prophylactic regimen) and 0.2–0.0125 mg/ml (treatment regimen). Samples with eprosartan (1.5 and 0.6 mg/ml) showed an increase in survival of mice by 50% and 20% compared with the virus control group in the *in vivo* model and, accordingly, an increase in average life expectancy of 5.2 and 2.1 days. Samples with ribavirin (0.05 and 0.025 mg/ml) increased the survival of mice by 60% and 40% and, accordingly, increased the life expectancy by 7.3 and 4.8 days. The data obtained allow recommending eprosartan as an active agent against tick-borne encephalitis virus along with ribavirin.

Keywords: tick-borne encephalitis virus, eprosartan, ribavirin, antiviral activity.

Введение

Роль РНК-содержащих вирусов в патологии человека сложно переоценить, в эту группу относят более десяти вирусных семейств, представители которых вызывают случаи заболеваний с тяжёлыми формами инфекционного процесса. Изучение флавивирусов необходимо для решения фундаментальных и прикладных вопросов

вирусологии, таких как лабораторная диагностика, создание живых ослабленных вакцин и противовирусных препаратов нового поколения. Вирус клещевого энцефалита относится к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*. Род *Flavivirus* включает около 80 различных видов вирусов, многие из которых являются патогенными для человека. Это вирус Зика, широко распространённый в Южной и Центральной Америке, вирусы Западного Нила и жёлтой лихорадки, циркулирующие в тропической Африке, вирус лихорадки Денге — в Азии, вирус японского энцефалита — на Дальнем Востоке и другие [1].

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: ул. Сельская 1, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток, 690087. E-mail: galinaleon41@gmail.com

Клещевой энцефалит (КЭ) — опасная природно-очаговая инфекция, характерная для лесной зоны Евразийского континента. В Российской Федерации эта инфекция имеет распространение от Балтийского побережья до берегов Тихого океана [2–4]. Благодаря колоссальному сходству принципов организации геномов и высокой структурно-функциональной консервативности белков-мишеней вирусов этого рода и семейства, полученные фундаментальные и прикладные знания о вирусе КЭ можно с уверенностью экстраполировать на всех представителей рода *Flavivirus* и на некоторых из семейства *Flaviviridae*. Ограниченный выбор специфических препаратов против вируса КЭ и других флавивирусов определяет актуальность поиска новых средств терапии этой болезни [5].

Цель работы — выявление ингибирующей активности препарата эпросартан в сравнении с рибавирином *in vitro* и *in vivo* по отношению к вирусу клещевого энцефалита.

Материал и методы

Использовали таблетки Теветен, содержащие 600 мг действующего вещества эпросартан, производитель Майлан Лэбораториз САС, Франция. Исходный раствор (60 мг/мл) был приготовлен в диметилсульфоксиде (ДМСО) (ПанЭко, Москва), затем разведение его делали на среде 199.

Использовали капсулы Рибавирина, содержащие в каждой капсуле 200 мг действующего вещества рибавирин, производитель ЗАО «Вертекс», Россия, г. Санкт-Петербург. Исходный раствор (100 мг/мл) был приготовлен в диметилсульфоксиде (ДМСО) (ПанЭко, Москва), затем разведение его делали на среде 199.

Клетки и вирус. Использована клеточная линия почек эмбриона свиней (СПЭВ), которую культивировали на среде 199 (производитель ООО НПП «ПанЭко»), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (производитель Ну Clone® South American original). Для проведения экспериментов клетки культуры СПЭВ высевали на 96-луночные микропланшеты и инкубировали при 37°C в присутствии 5% CO₂. Опыты проводили на односуточной культуре клеток.

В работе использовали штамм Dal'negorsk (Dal') вируса КЭ, выделенный из мозга пациента, умершего от КЭ. При изучении биологических свойств штамм был охарактеризован как высоковирулентный, по данным полногеномного секвенирования, отнесён к типичным представителям ВКЭ дальневосточного субтипа и зарегистрирован в GeneBank №FJ402886 [6]. Для проведения экспериментов после предварительного титрования готовили исходный запас штамма вируса КЭ, который хранили при -70°C. Во всех модельных схемах исследований клетки СПЭВ инфицировали вирусом КЭ при множественности инфекции (MOI 0,01 TCID₅₀/кл).

Анализ цитотоксичности вещества (CC₅₀) *in vitro*. Цитотоксическую активность вещества определяли с использованием анализа МТТ. На односуточный монослой клеток в 96-луночных микропланшетах наносили различные концентрации вещества в 3 повторях. Обработанные клетки инкубировали с веществом в течение 4 сут при 37°C с последующим добавлением в каждую лунку по 15 мкл раствора МТТ (метилтиазолилтетразолия бромид) в концентрации 5 мг/мл и инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Затем добавляли изопропиловый спирт, подкисленный 0,4М HCl (150 мкл/лунку). Оптическую плотность (ОП) измеряли на 96-луночном ридере (Labsystems Multiscan RC, Финляндия) при длине волны 540 нм. Жизне-

способность клеток оценивали как $CC_{50} = \text{ОП опыта} / \text{ОП клеточного контроля} \times 100\%$.

Модельные схемы экспериментальных исследований механизмов действия вещества.

Внеклеточное вирулицидное действие: равное количество выбранных доз вещества и ВКЭ соединяли (контакт 2 ч), смесью заражали монослой клеток СПЭВ, через 1 ч контакта трижды отмывали и заливали поддерживающей средой без сыворотки.

Профилактическое действие: разными дозами вещества заливали монослой клеток СПЭВ, через 2 ч контакта вещество убирали и добавляли ВКЭ, через 1 ч монослой отмывали и заливали поддерживающую среду.

Прямое антивирусное действие: монослой клеток заражали ВКЭ и одновременно добавляли вещество, через 1 ч отмывали и заливали поддерживающую среду.

Внутриклеточная ингибция: монослой клеток заражали ВКЭ, через 1 ч отмывали и добавляли вещество, приготовленное на поддерживающей среде.

Каждую пробу исследовали в 4 повторях на 96-луночном планшете. Культуральную жидкость опытных проб собирали через 48 ч в один сток из 4 лунок. Дальнейшие исследования по определению ингибции ВКЭ проводили следующими методами: определение ОП в ИФА, определение титра вируса по цитопатическому действию (ЦПД). Проверку инфекционности отдельных проб проводили на модели беспородных белых мышей (16–18 г) путём подкожного заражения по 0,2 мл (10 экз. на каждую точку).

Статистический анализ. Для расчёта половины максимальной цитотоксической концентрации (CC₅₀), а также половинной максимальной ингибирующей концентрации (IC₅₀) тестируемых соединений использовали программное обеспечение Graph Pad Prism для Windows, версия 7 (Graph Pad Software Inc., Сан-Диего, Калифорния, США). Данные анализировали с помощью нелинейного регрессионного анализа.

Значение индекса селективности (SI) определяли как отношение CC₅₀ к IC₅₀.

Результаты и обсуждение

Токсичность эпросартана и рибавирина измеряли с помощью анализа МТТ относительно клеток СПЭВ. Установлено, что значение половинной максимальной цитотоксической концентрации (CC₅₀) для эпросартана составило 8,8±1,2 мг/мл, для рибавирина — 1,074±0,16 мг/мл. Получено, что рибавирин в 8 раз токсичнее эпросартана. Установленные, а также меньшие концентрации веществ не цитотоксичны и могут хорошо переноситься клетками СПЭВ.

Для получения среднеэффективной вирусингибирующей концентрации (IC₅₀) препаратов использовали данные ИФА. Получены показатели оптической плотности (ОП) антигена ВКЭ при разных модельных схемах эксперимента с разными концентрациями вещества. В таблице показана ингибирующая активность обоих веществ, которая выявлена только в четвертой опытной схеме (внутриклеточная ингибция вируса или условно при лечебной схеме применения препаратов).

С помощью нелинейного регрессионного анализа показателей процента антиген положительных проб получены значения IC₅₀ изучаемых веществ. Среднеэффективная вирусингибирующая концентрация эпросартана при лечебной

Противовирусная активность эпросартана и рибавирина по отношению к вирусу клещевого энцефалита при модельной схеме эксперимента — внутриклеточная ингибция

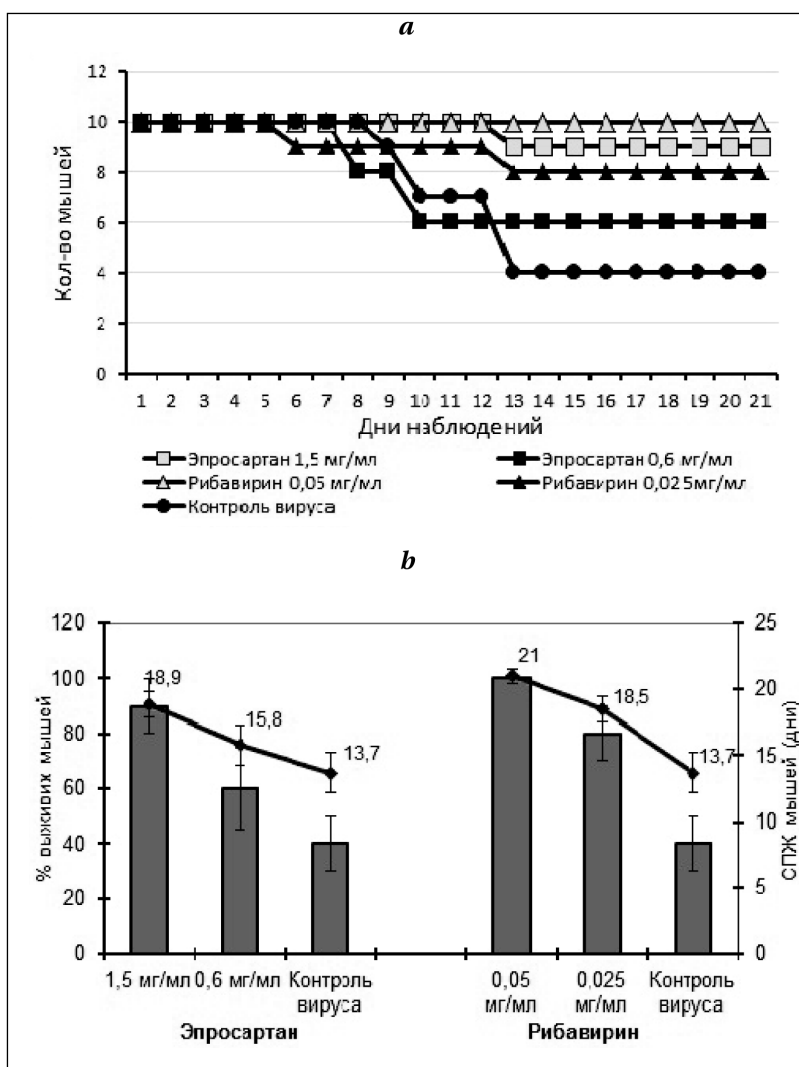
Вещества	Концентрация, мг/мл	ИФА		Титрование вируса в пробах		
		Показатель ОП антигена ВКЭ	антиген + пробы (%)	Титр вируса $\log TCID_{50} \pm SD$	Подавление репродукции вируса $\Delta \log TCID_{50}$	Ки, %
Эпросартан	3,0	0,2	2,3	0	5,5	100
	1,5	0,2	2,4	0	5,5	100
	1,2	1,9	27,8	$3,0 \pm 0,1$	2,5	45,4
	0,6	6,5	91,3	$4,5 \pm 0,2$	1,0	18,1
Рибавирин	0,2	0,21	2,9	0	5,5	100
	0,1	0,23	3,2	$1,0 \pm 0,1$	4,5	81,8
	0,05	0,26	3,6	$1,5 \pm 0,2$	4,0	72,7
	0,025	0,4	5,6	$2,0 \pm 0,2$	3,5	63,6
	0,0125	1,5	21,1	$3,0 \pm 0,2$	2,5	45,4
	0,0075	5,3	74,6	$4,5 \pm 0,3$	1,0	18,1
Контроль репликации вируса спустя 48 ч после заражения клеток		7,1		$5,5 \pm 0,3$		

схеме составила $0,64 \pm 0,23$ мг/мл. Исходя из этих данных, получен селективный индекс (SI) или химиотерапевтический индекс (ХТИ), который составил 13,7.

Среднеэффективная вирусингибирующая концентрация рибавирина при лечебной схеме составила $0,0067 \pm 0,0015$ мг/мл. Исходя из этих данных, получен SI или ХТИ, который равен 160.

Выявление неингибированного вируса КЭ с помощью титрования этих проб на культуре клеток СПЭВ показало, что подавление репродукции вируса $\geq 2,0 \log TCID_{50}$ происходило под действием эпросартана при концентрациях 1,2–3,0 мг/мл (лечебная схема), рибавирина — 0,2 мг/мл (профилактическая схема) и 0,2–0,0125 мг/мл (лечебная схема). На модели *in vivo* получены данные по сравнительному действию на вирус КЭ исследуемых препаратов (рисунок).

Пробы с эпросартаном (1,5 и 0,6 мг/мл) по сравнению с контролем вируса показали увеличение выживаемости до 50 и 20% и, соответственно, увеличение жизни животных на 5,2 и 2,1 дней. Пробы с рибавирином (0,05 и 0,025 мг/мл) увеличивали выживаемость на 60 и 40% и, соответственно, увеличивали жизнь животных на 7,3 и 4,8 дней. Результаты *in vivo* подтвердили данные исследований *in vitro*, полученные в ИФА, и по титрованию неингибированного вируса на культуре клеток СПЭВ (таблица).



Показатели инфекционности проб *in vivo* при экспериментальной схеме — внутриклеточная ингибция вируса клещевого энцефалита под действием эпросартана и рибавирина:

a — динамика гибели животных, срок наблюдения 21 день; *b* — степень выживаемости (%) и средней продолжительности жизни (СПЖ) белых мышей, зараженных пробами с препаратами эпросартан и рибавирин, ингибирующими вирус КЭ.

В настоящих исследованиях мы руководствовались правилами проведения доклинических исследований лекарственных средств [7], а также опытом подобной работы, проведённой нами ранее [8, 9].

В медицинской практике в числе противовирусных препаратов используют структурные аналоги природных нуклеозидов, таких как ацикловир, рибавирин, которые демонстрируют высокую противовирусную активность. Известно, что рибавирин (синтетический аналог нуклеозидов 1- β -D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) характеризуется широким спектром противовирусного действия в отношении ДНК- и РНК-содержащих вирусов. Отмечено ингибирующее действие этого препарата на репликацию ряда флавивирусов в различных клеточных культурах [10, 11]. При этом исследователи [12, 13] считают, что противовирусная активность рибавирина может быть обусловлена ингибированием фермента инозинмонофосфат дегидрогеназы клеток хозяина, который снижает внутриклеточные запасы гуанозинтрифосфата, в результате чего опосредованно угнетается синтез нуклеиновых кислот вируса с последующим нарушением его транскрипции.

Полученные выше результаты при высокой дозе рибавирина (0,2 мг/мл) в профилактической модельной схеме косвенно указывали на приобретённые качественные изменения ферментативной активности клеток СПЭВ, которые могли оказать негативное влияние на синтез нуклеиновых кислот вируса ($K_i=54,5\%$). Прямое угнетающее действие рибавирина на активность полимеразы вируса КЭ показано в опытах четвёртой модельной схемы, результаты которой непосредственно свидетельствовали о внутриклеточной ингибции вируса.

Выбор другого препарата с активно действующим веществом эпросартан был основан на исследованиях творческой группы специалистов [14], которые, используя конвейер виртуального скрининга, сконструировали структуры протеазы NS3 и полимеразы NS5 вируса Зика, представителя рода *Flavivirus*. Авторы показали, что некоторые из обнаруженных лигандов продемонстрировали тесное сродство к уязвимым сайтам в обоих белках. Препарат против гипертонии эпросартан вошёл в число такого выбранного лиганда. На основе предыдущих исследований па-

тогенных свойств вируса КЭ было определено, что уязвимый сайт NS3 полимеразы расположен между белком NS3 и кофактором NS2B [6, 15]. Результаты расчётов виртуального скрининга структуры протеазы NS3 и полимеразы NS5 вируса Зика [14] показали возможность экстраполировать их для вируса КЭ и, очевидно, для других представителей вирусов рода *Flavivirus*. На основании этих расчётов эпросартан был использован нами для изучения его ингибирующей активности против высоковирулентного штамма вируса КЭ в сравнении с известным и хорошо изученным противовирусным препаратом рибавирин для многих РНК- и ДНК-патогенных вирусов. Результаты комплексного исследования *in vitro* и *in vivo* действия препаратов эпросартан и рибавирин на вирус КЭ наглядно продемонстрировали внутриклеточную ингибцию репликации вируса. Несмотря на то что противовирусная активность рибавирина была выше более чем в 10 раз ($X_{ТИ}=160$) по сравнению с эпросартаном ($X_{ТИ}=13,7$), этот изученный препарат можно отнести к числу перспективных ингибиторов вируса КЭ.

Заключение

Представленные данные позволяют наряду с рибавирином рекомендовать препарат эпросартан в качестве ингибирующего средства против вируса КЭ. Для получения комплексного представления о противовирусной активности препарата целесообразно продолжить исследования с использованием низковирулентного штамма вируса КЭ, что позволит обосновать эффективность поиска противовирусных препаратов методом молекулярного моделирования. Подбор и применение химических соединений, ингибирующих репликацию вирусов и идентифицированных на основе методов молекулярного моделирования, представляют современное направление в поиске эффективных противовирусных препаратов.

Работа поддержана научным проектом (0545-2019-0007) Федерального Государственного бюджетного научного учреждения.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lindenbach B.D., Thiel H.J., Rice C.M. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. In: Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.) *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 1101–1152.
2. Злобин В.И. Эпидемиологическая обстановка и проблемы борьбы с клещевым энцефалитом в Российской Федерации. Бюлл. сиб. мед. — 2006/ — 5. — Прил. 1. — С. 16–23. / Zlobin V.I. Epidemiologicheskaya obstanovka i problemy borby s kleshchevym entsefalitom v Rossiyskoy Federatsii. Byull Sib Med 2006; 5: 1: 16–23. [in Russian]
3. Леонова Г.Н. Клещевой энцефалит: актуальные аспекты. М. Издатель И.В. Балабанова, 2009. / Leonova G.N. Kleshchevoy entsefalit: aktualnyye aspekty. M. Izdatel I.V. Balabanova, 2009. [in Russian]
4. Иерусалимский А.П. Клещевые инфекции в начале XXI века. Неврологический журнал. — 2009. — № 3. — С. 17–21. / Ierusalimskiy A.P. Tick-borne infections in the beginning of the XXI century. Nevrologicheskii Zhurnal 2009; 3: 17–21. [in Russian]
5. Логинова С.Я., Борисевич С.В., Русинов В.Л., Уломский У.Н., Чарушин В.Н., Чупахин О.Н. Изучение противовирусной активности триазавирина в отношении возбудителя клещевого энцефалита в культуре клеток. Антибиотики и химиотер. — 2014. — № 1–2. — С. 3–5. /

Loginova S.Ja., Borisevich S.V., Rusinov V.L., Ulomskij U.N., Charushin V.N., Chupahin O.N. Izuchenie protivovirusnoj aktivnosti triazavirina v otnoshenii vzbuditelja kleshhevogo jencefalita v kul'ture kletok. Antibiotiki i khimioter 2014; 1–2: 3–5. [in Russian]

6. Belikov S.I., Kondratov I.G., Potapova U.V., Leonova G.N. The Relationship between the Structure of the Tick-Borne Encephalitis Virus Strains and Their Pathogenic Properties. PLoS One 2014. Apr 16; 9 (4): e94946. doi: 10.1371/journal.pone.0094946. eCollection 2014
7. Миронов А.Н., Буянтян Н.Д. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012. — 944 с. / Mironov A.N., Bunyatyan N.D. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast pervaya. M.: Grif i K; 2012; 944. [in Russian]
8. Крылова Н.В., Леонова Г.Н. Противовирусная активность препаратов с различным механизмом действия при экспериментальном клещевом энцефалите. Вopr. вирусол. — 2016. № 61 (3). — С. 139–144. doi: 10.18821/0507-4088-2016-61-3- 139-144. / Krylova N.V., Leonova G.N. Protivovirusnaya aktivnost preparatov s razlichnym mekhanizmom deystviya pri eksperimentalnom kleshchevom entsefalite. Vopr virusol 2016; 61 (3): 139–144. doi: 10.18821/0507-4088-2016-61-3- 139-144. [in Russian]
9. Леонова Г.Н., Шутикова А.Л., Лубова В.А., Майстровская О.С. Ингибирующая активность флавоноидов байкальского шлемника относительно вируса клещевого энцефалита. Бюлл эксперим биологии и
- медицины. — 2019. — Т. 168. — № 11. — С. 611–614. / Leonova G.N., Shutikova A.L., Lubova V.A., Maystrovskaya O.S. Ingibiruyushchaya aktivnost flavonoidov baykalskogo shlemnika otnositelno virusa kleshchevogo entsefalita. Byull Eksperim Biologii i Meditsiny 2019; 168: 11: 611–614. [in Russian]
10. Huggins J.W. Prospects for treatment of viral hemorrhagic fevers with ribavirin, a broad-spectrum antiviral drug. Rev Infect Dis 1989; 11 (Suppl 4): 750–761.
11. Jordan J., Briese T., Fischer N., Lau J.Y., Lipkin W.I. Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effect in neural cells. J Infect Dis 2000; 182 (4): 1214–1217.
12. Dixit N.M., Perelson A.S. The metabolism, pharmacokinetics and mechanisms of antiviral activity of ribavirin against hepatitis C virus. Cell Mol Life Sci 2006; 63 (7–8): 832–842.
13. Parker W.B. Metabolism and antiviral activity of ribavirin. Virus Res 2005; 107: 165–71.
14. Feranchuk S., Potapova U., Belikov S. Virtual screening of inhibitors for the Zika virus proteins. bioRxiv 060798; doi: http://dx.doi.org/10.1101/060798
15. Potapova U.V., Feranchuk S.I., Potapov V.V., Kulakova N.V., Kondratov I.G., Leonova G.N., Belikov S.I. NS2B/NS3 protease: allosteric effect of mutations associated with the pathogenicity of tick-borne encephalitis virus. J Biomol Struct Dyn 2012; 30: 638–651.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Леонова Галина Николаевна — д. м. н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории природно-очаговых инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

Майстровская Ольга Сергеевна — младший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых инфекций

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

Лубова Валерия Александровна — младший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток